

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS**1. Doelstelling**

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filtersigaretten met behulp van gaschromatografie en massaspectrometrie (GC-MS). Deze methode is gebaseerd op WHO TobLabNet SOP 16.

2. Toepassingsgebied

Deze analysemethode is van toepassing voor het bepalen van componenten van de lijst verboden additieven in tabak en filtersigaretten, maar kan ook voor andere vluchtige componenten in tabak en filtersigaretten worden ingezet die met GC-MS gemeten kunnen worden.

Definitie	Beschrijving
Tabak	Gedroogde bladeren van de tabaksplant
Filtersigaret	Sigaret met een filter in het mondstuk

Tabak en filtersigaretten worden onderzocht op de aanwezigheid van vluchtige componenten. De methode kan gebruikt worden om vast te stellen of de componenten een verboden additief is (zie tabel in GZB-I-785A)

3. Principe

Tabak en filters uit sigaretten en Heated Tobacco Products (HTP) worden gescreend met GC-MS op aanwezige vluchtige componenten. Voor pieken in de chromatogrammen die een signaal-ruisverhouding (S/N) hoger dan 10/1 hebben, wordt de hoogste hit in de NIST bibliotheek genoteerd, met daarbij in ieder geval de stofnaam, het CAS-nummer, de retentietijd en de match factor. Indien de match factor van de hoogste en één na hoogste hits vergelijkbaar zijn (binnen de 5%), worden beiden genoteerd. De aanwezigheid van de gevonden stoffen wordt vervolgens geverifieerd met behulp van standaarden. De hierin beschreven methode is niet geschikt voor het onderscheiden van stereo-isomeren.

4. Reagentia en oplossingen

Alle reagentia dienen analytisch zuiver te zijn. De reagentia worden, indien mogelijk, bij Merck besteld.

4.1 Xyleen-D10

4.2 Methyl tert-butyl ether (MTBE)

4.3 Hexaan

4.4 Interne standaard (IS) oplossing

Voeg aan 1 L hexaan:MTBE (90:10) v/v% 100 µL xyleen-D10 toe. De I.S. oplossing is een maand houdbaar op kamertemperatuur in een goed afgesloten fles. Opmerking: Van deze I.S. oplossing moet een dusdanige hoeveelheid worden aangemaakt, zodat alle monsters en standaardoplossingen met één en dezelfde oplossing bereid kunnen worden. Per monster is ca. 10 ml I.S. oplossing nodig, voor het maken van de standaardoplossingen, test oplossingen en monsters is ca. 200 ml I.S. oplossing nodig.

4.5 KWM01, recoverystandaard menthol. Weeg 100 mg menthol af in een 10 ml maatkolf en vul aan tot 10 ml met IS oplossing (concentratie= 10 mg/ml). Per batch wordt er een nieuw kwaliteitsmonster bereid.

5. Apparatuur

Algemene laboratoriumapparatuur, met in het bijzonder:

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS

- 5.1 Verdringingspipet, elektronisch (Eppendorf Repeater stream (PIPA3022-33 / PIPA3022-34 / PIPA3.022-60 / PIPA3.022-59 / PIPA3.022-58 / PIPA3.022-57 / PIPA3020-17)).
- 5.2 Gaschromatograaf voorzien van een MS-quadrupole detector (Agilent 7890 GC / 5977C MSD) (GCMS/01)
- 5.3 GC-kolom: J&W inertcap aquatic-2 (260°C): 60 m x 250 µm x 1,4 µm
- 5.4 Maalmachine (MAAL/02)
- 5.5 Schudmachine (SCH/10)

Veiligheid

Componenten in tabak en filtersigaretten kunnen mogelijk leiden tot allergische huidreacties, dit betreft o.a. limonene, linalool en eugenol. Zie KAM003 voor het veilig werken met stoffen.

6. Werkwijze**6.1 Algemeen**

Om te controleren dat het systeem correct werkt en de relatieve retentietijden voldoen, wordt er voor de analyse driemaal een testoplossing gedraaid met daarin de interne standaard en een standaard die representatief is voor de te verwachte componenten (zie ook 6.3 analyse met GC-MS). Om vals positieve hits te voorkomen wordt de carry-over in elke serie getest. De eisen die aan deze test worden gesteld, worden in 6.7 weergegeven.

6.2 Monsteropwerking

Voor zowel de identificatie als de verificatie wordt er apart opgewerkt.

- Per opwerking worden blanco CM9 tabak en filter sigaretten meegenomen. Noteer het blanco tabak gewicht in GZB-F-785
- Verwijder per order van 8 sigaretten uit één pakje de tabak en het filter van het papier.
 - o Vang de tabak op in een maalcup welke voor MAAL/02 gebruikt kan worden. Het papier rond het filter wordt niet verwijderd van het filter en noteer het gewicht van de tabak van 8 sigaretten voor het malen in GZB-F-785.
 - o Snij of knip 2 filters in de lengte door en breng de 4 halve filters over in een 15 ml centrifugebuis (indien van toepassing).
- Bewaar overgebleven filters en tabak afgesloten in de maalcups in de monsterkast in A3.022 voor eventuele heranalyses
- Maal de tabak met behulp van MAAL/02 voor 30 seconden op 10.000 RPM.
- Weeg 1 gram gemalen tabak af en breng het over in een 15 ml centrifugebuis en noteer de weging in GZB-F-785.
- Neem voor de extractie een blanco opwerking mee zonder matrix.
- Pipetteer 10 ml IS per centrifugebuis en vortex voor 5 seconden. Vanwege de vluchtigheid van de componenten dienen de centrifugebuizen, vials en bekeerglazen zoveel mogelijk gesloten gehouden worden.
- Schud de centrifugebuizen met behulp van SCH/10 voor 5 minuten met 200 RPM.
- Laat de matrix voor 15 minuten bezinken en schud nogmaals voor 5 minuten met 200 RPM.
- Centrifugeer de buizen voor 10 minuten op 4000 RPM.
- Zuig ongeveer 2 ml van het extract op m.b.v. een spuit en breng het via een PTFE filter over in een GC-MS vial met schroef dop.

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS

6.3 Analyse met GC-MS

Injecteer de monster- en standaardoplossingen en analyseer de vials volgens de in bijlage 1 weergegeven condities. De wasflessen van de GC dienen gevuld te worden met acetonitril. De acquisitie GCMS methode wordt op de C: schijf van de betreffende PC opgeslagen onder: *C:\MassHunter\GCMS\1\methods\TRPM8\Gevalideerd*. De ruwe data worde opgeslagen op de R: schijf onder: *R:\Projecten\ZZZ132015_Tabaksonderzoek ruwe data lab\jjj\Handhaving TRPM8\Ruwe data\JJJMMDD_initialen analist*

Voor zowel de identificatie als verificatie wordt de ASTM noise berekening toegepast voor het berekenen van de S/N, waarbij de multiplier op 1 wordt ingesteld. De noise regions per gevonden component dient vastgesteld te worden. Er wordt een standaard interval van 0,5 min gehanteerd voor of na de piek. Dit hangt af van de eventuele aanwezigheid van nevenpieken in het interval. Er mag geen storing van nevenpieken in de noise berekening plaatsvinden.

Elke serie wordt voorafgegaan door 1 vial gevuld met een test-oplossing (een mix met daarin 2 standaarden van representatieve additieven en IS). Deze testoplossing wordt in triplo gemeten. Deze testoplossing wordt gebruikt om het GC-systeem te stabiliseren en te controleren. De testoplossing wordt bereid door in een 1,5 ml vial 900 µl IS oplossing, 50 µl 2 mg/ml menthol en 50 µl 2 mg/ml WS-23 toe te voegen. Hoe de 1 mg/ml standaarden worden bereid is in 6.6.1. weergegeven. De relatieve retentietijden (RRT) tussen IS – referentiestandaard, van de 1^{ste} en 3^{de} injectie van de testoplossing, worden bepaald door de retentietijd van de IS te delen door de retentietijd van de referentiestandaard. Het RRT- verschil tussen de 1^{ste} en 3^{de} injectie van de testoplossing mag niet groter dan 0,01 min zijn. Indien dit wel het geval is, worden de testoplossingen opnieuw gemeten.

Alle tabak- en filter extractieoplossingen dienen in enkelvoud geïnjecteerd te worden. Analyseer als eerste twee blanco's, gevolgd door drie injecties van de testoplossing, injecteer vervolgens een blanco oplossing. Begin daarna aan de analyse van de monsters. Na elke monstermeting dient er een blanco meting uitgevoerd te worden voor het minimaliseren van carry-over.

Tijdens identificatie en verificatie wordt er een kwaliteitsmonster (4.5) meegenomen voor een recoverybepaling van menthol met behulp van een 1-punts kalibratie. De procedure wordt in 6.7.1 beschreven. Indien gevraagd door de opdrachtgever wordt er ook een semi kwantitatieve bepaling uitgevoerd door middel van een 1-puntskalibratie. Deze procedure wordt in 6.6.4. beschreven. De kwaliteitsmonsters worden random in de meetsequence toegevoegd.

Het verwerken van de resultaten gaat via GZB-F-785. Dit is een gevalideerd sjabloon voor de resultaten van de identificatie, verificatie en rapportage van de NTA in tabak en filters.

6.4 Identificatie van de componenten

De monster- en standaardoplossingen worden bij de identificatie gemeten in scan-mode, waaruit een Total Ion Chromatogram (TIC) wordt verkregen. Vanuit de TIC worden de piekarea's, retentietijden, piekhoogte en signal/noise ratio genoteerd. Deze procedure wordt in 6.6.3. beschreven.

Pieken boven een S/N van 10/1 worden geïdentificeerd met de NIST bibliotheek. De hit wordt genoteerd, met de volgende gegevens: stofnaam, CAS-nummer, retentietijd en match factor. Indien de match factoren van de hoogste 2 hits binnen 5% van elkaar liggen, worden deze gegevens voor de hoogste 2 hits genoteerd. Bij het meten van tabak en filters op niet-toegestane additieven, wordt er eerst gekeken naar alle pieken boven een S/N van 10/1.

Zie 6.7 Kwaliteitscontrole voor de kwaliteitseisen aan de interne standaarden. Indien de interne standaard van een monster niet voldoet, dient de monsteroplossing opnieuw geanalyseerd te worden. De resultaten van de identificatie worden in formulier GZB-F-785 ingevuld.

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS

6.5 Vaststelling of component op lijst verboden additieven staat

Voor het onderzoek van de NVWA wordt voor alle hits boven de S/N 10/1 gekeken of het een component van de lijst verboden additieven betreft. Hiervoor kan GZB-I-785A geraadpleegd worden. Indien een component uit de screening een stof van de lijst verboden additieven betreft, wordt de betreffende referentiestandaard aangeschaft, zie 6.6 voor de verificatie uitvoering. Indien deze SOP voor andere toepassingen wordt gebruikt kunnen ook andere componenten worden meegenomen voor verificatie.

6.6 Verificatie van de componenten

De monsters- en standaardoplossingen worden bij de verificatie ook gemeten in Scan mode. Echter in de uitwerk Quantitative methode worden de quantifiers toegevoegd waarbij een EIC (Extracted Ion chromatogram) wordt verkregen. De S/N wordt echter eerst bepaald in de TIC mode om te bepalen of de componenten boven een S/N van 10 vallen. Hoe dit wordt uitgevoerd is in 6.6.3. weergegeven.

Voor de te verifiëren componenten uit de screening, worden de betreffende referentiestandaard(en) aangeschaft. Voor gebruik referentiestandaarden, zie GZB-603.

Wanneer er meerdere verpakkingen van 1 ordernummer worden geleverd, dient er voor de identificatie 8 sigaretten uit 1 verpakking opgewerkt te worden en voor de verificatie ook 8 sigaretten uit 1 andere verpakking van dezelfde batch. Dit om vals positieve en vals negatieve resultaten te voorkomen. Tevens wordt er een beter beeld verkregen van een batch.

Dus wanneer er tijdens de verificatie extra componenten gevonden worden, die niet geïdentificeerd zijn tijdens de identificatie, dient de verificatie van de sample opnieuw uitgevoerd te worden voor alle componenten hits. Hetzelfde geldt voor componenten die tijdens de verificatie niet geverifieerd worden, maar wel zijn geïdentificeerd tijdens de identificatie.

6.6.1 Bereiding referentie en kalibratie standaard

Er wordt een concentratie van 100 µg/ml aangehouden voor de referentie en kalibratie standaard.

- Weeg 50 mg standaard af in een 25 ml maatkolf (concentratie 2 mg/ml) en vul aan tot de maatstreep met IS
 - o Indien de standaard een vloeistof is, wordt er druppelsgewijs 50 mg afgewogen m.b.v. een glaspipet.
- Verdun 20x door 50 µl van de stock op te lossen in 950 µl IS oplossing (concentratie 100 µg/ml) in een 1,5 ml vial.

6.6.2 GC-MS metingen

De referentiestandaarden worden aan het begin van dezelfde sequence als de tabak en filter monsters gemeten. Indien het relatieve retentietijd verschil meer afwijkt dan de toegestane tijd (0,01 min), moet ter controle de referentiestandaard en het betreffende monster direct na elkaar gemeten worden. In 6.3 wordt weergegeven wat er bedoeld wordt met het RRT- verschil. Wanneer er tijdens de identificatie blijkt dat er twee hits met een match factor verschil kleiner dan 5 van elkaar liggen, moeten de bijhorende twee standaarden meegenomen worden. Eén sequence bevat niet meer dan 10 monsters (tabak+filters) om de workflow optimaal te houden. De (meng) standaard(en) voor semi kwantitatief onderzoek wordt voor het meten van de monsters gemeten.

In GZB-F-785 wordt er onderscheid in tabbladen tussen filters en tabak gemaakt. Bij de identificatie en verificatie worden in 1 sequence zowel tabak en filter monsters meegenomen.

6.6.3 Data processing Masshunter

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS

- De Unknowns en Quantitative analyse/batch files worden opgeslagen onder: :
R:\Projecten\ZZZ132015_Tabaksonderzoek ruwe data lab\2025jjjj\Handhaving TRPM8\Ruwe data \JJJMMDD_initialen analist
- Identificeer de componenten per e-liquid via het programma Unknowns analysis. Het gaat hierom verboden componenten- hits met de grootste area en piekhoogte. Kopieer de component, CAS-nummer en match factor in de standaard report file in Excel.
- Maak een Quantitative methode aan met de geïdentificeerde componenten in Unknowns
 - o De identificatie resultaten zijn gebaseerd op de TIC waardes
 - o De verificatie, semi- kwantitatieve en kwaliteitsmonster resultaten zijn gebaseerd op de EIC waardes met uitzondering van de S/N. Deze resultaten zijn gebaseerd op de TIC waardes.
- Open de batch en de gemaakte Quantitative methode in de Quantitative analysis software.
 - o Voeg de desbetreffende componenten toe in de Quantitative methode
 - Voor TIC resultaten worden de massa's op 0,0 gezet (identificatie)
 - Voor de identificatie wordt de noise calculation ingesteld op ASTM met 1 als multiplier waarde. Bepaal ook de noise regions met een 0,5 min +/- interval voor of na de piek. De noise region dient vrij te zijn van storingspieken. Indien net voor of net na de piek geen region te bepalen is, wordt het eerstvolgende 0,5 min interval basislijn gebruikt voor de noise calculation. Noteer altijd de noise region per component.
 - Voeg EIC resultaten worden de quantifiers toegevoegd aan de methode (verificatie).
- Noteer de retentietijden, area's, piekhoogten en S/N van de samples via de Quantitative analysis software in de standaard report file. Indien er niet goed geïntegreerd is, dient er handmatig geïntegreerd te worden.

6.6.4 Uitwerking verificatie

- Controleer of NIST de juiste identificatie geeft voor een bekende standaard
- Controleer en noteer de S/N en de noise regions vanuit de TIC. De overige resultaten worden uit de EIC gehaald.
- Controleer of het relatieve retentietijd verschil van IS – referentiestandaarden ten opzichte van IS - monster kleiner is dan 0,01 min.
- Optioneel: Bepaal semi-kwantitatief, aan de hand van de standaard en monster, de concentratie in µg/ml. Doe dit met behulp van de respons ratio (piek area's) tussen IS en component. Zie formule hieronder:
 - o $Gehalte\ \mu g/sigaret = (concentratie\ standaard\ in\ \mu g/ml * relatieve\ respons\ monster / relatieve\ respons\ standaard) * 10 (extractievolume\ in\ mL) * inweeg\ 8\ sigaretten\ (in\ gr) / inweeg\ in\ gr\ (\sim 1\ gram) / 8 (aantal\ sigaretten)$
 - o $Gehalte\ \mu g/filter = (concentratie\ standaard\ in\ \mu g/ml * relatieve\ respons\ monster / relatieve\ respons\ standaard) * 10 (extractievolume\ in\ mL) / 2 (aantal\ geëxtraheerde\ filters)$
- De resultaten van de verificatie worden in formulier GZB-F-785 ingevuld.

6.7 Kwaliteitscontrole

- Algemeen: controle op carry-over: uitsluiten van aanwezigheid componenten in blanco's. Bepaal de detector respons (piekoppervlakte) van een blanco oplossing, welke onmiddellijk volgt na injectie van een monster. Het blanco signaal van de te bepalen analyt moet ≤ 0,2% zijn t.o.v. de piekoppervlakte van deze analyt in het monster.
- Vul de verkregen resultaten van het recoveryonderzoek (6.7.1.) in de controlekaarten in voor menthol, zie map *R:\Projecten\E132015_Tabak Monitoring en Handhaving\Kwaliteit\Controlekaarten\Verboden additieven*. Volg procedure cf. GZB-756. Zie 6.7.1. voor het bereiden van het kwaliteitsmonster.
- De retentietijd van de interne standaard mag gedurende de sequence niet meer variëren dan 0,2 min ten opzichte van de eerste injectie.

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS

- De resultaten worden in formulier GZB-F-785 ingevuld.

Indien controles niet overeenkomen met de gestelde eisen wordt een oplossing gezocht in overleg met de betrokken onderzoeksleider of projectleider.

6.7.1. Recovery onderzoek

Recoveryonderzoeken worden tijdens de identificatie en verificatie uitgevoerd. Voor recovery onderzoek wordt vanuit de recoverystandaard (4.5) een kwaliteitsmonster bereid:

- Maal de tabak van 8 sigaretten van referentiesigaret CM9 en weeg 1 gram tabak af in een 15 ml centrifugebuis.
- Breng 4 halve filters van hetzelfde referentiemonster over in een 15 ml centrifugebuis
- Maak een menthol kalibratie standaard volgens 6.6.1.
- Spike 100 µl van de recoverystandaard (4.5) in de twee 15 ml centrifugebuizen en vul aan met 9,9 ml IS oplossing (4.4).
- Extraheer de recovery monsters conform 6.2.
- Bereid een kalibratiestandaard menthol cf. 6.6.1 en voeg deze toe aan de sequence
- Bereken de recovery met conform bijlage 3.

De recovery resultaten van menthol worden in de betreffende controlekaarten ingevuld (6.7).

7. Validatie

De validatie is uitgevoerd zoals vastgelegd in het validatieplan (Methodeontwikkeling en validatieplan verkoelende stoffen-def- R:\Projecten\V090071_Tabakswet\2024\2. Uitvoering 5. Ontwikkeling test- en analysemethoden - verkoelende stoffen\2.1 Aanpak.

Deze validatie is gebaseerd op een kwantitatieve bepaling. Dit was de originele opdracht van uit de opdrachtgever. Deze targeted analyse werd in combinatie met de non-targeted screening uitgevoerd. De opdrachtgever heeft uiteindelijk besloten dat de TRPM8 targeted methode toch niet geheel kwantitatief, maar semi- kwantitatief uitgevoerd moet worden. Er was, samen met de project- en onderzoeksleider, besloten om toch door te gaan met de gehele kwantitatieve validatie en in deze SOP de werkwijze voor een semi-kwantitatieve methode te beschrijven. Een validatie aan de hand van een kwantitatieve bepaling is ook geschikt voor een semi-kwantitatieve bepaling.

De uitwerking van de resultaten zijn opgenomen in het validatie verslag (Validatierapport_TRPM8-def- R:\Projecten\V090071_Tabakswet\2024\2. Uitvoering 5. Ontwikkeling test- en analysemethoden - verkoelende stoffen\2.3 Resultaten\TRPM8-2024 deel 2\Validatie). Deze dossiers zijn digitaal opgeslagen in LIMS (B00020, RP2023/016) en blijven bewaard. In bijlage 2 is een samenvatting van de resultaten weergegeven.

8. Literatuur

- WHO TobLabNet SOP 16

9. Samenhangende documenten

GZB-759	GC gebruikerscontrole
GZB-603	Referentiesubstanties en huisstandaarden: beheer en gebruik
GZB-605	Validatie meet- en analysemethoden
GZB-912	Chemicaliënbeheer GZB
GZB-913	Apparatuurbeheer GZB

GZB-785

Versie: 1
Datum: 01-05- 2025**Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS**

GZB-I-916A	Werkafspraken laboratoria GZB
GZB-I-785A	Lijst verboden additieven
GZB-F-785	Sjabloon identificatie & verificatie NTA tabak en filters
GZB-756	Kwaliteitsborging door een eerstelijnscontrole met behulp van controlekaarten
KAM003	Gevaarlijke stoffen
KAM007	Gevaarlijk afval

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS**Bijlage 1. Instellingen GC-MS**

Agilent GC 7890B system	
Autosampler	
Injection volume	1 µl
# of rinses with solvent (pre-run)	4
# of rinses with solvent (post-run)	4
# of rinses with sample	1
Viscosity delay	1,0 sec
Plunger speed (Injection)	6000 µl/min
Syringe insertion speed	High
Injection mode	Standard
Pumping times	5 times
Injection port dwell time	0,0 sec
Terminal air gap	yes
Plunger washing speed	300 µl/min
Solvent selection	A,B
Injector	
Injection Mode	Split
Temperature	200 °C
Carrier Gas	He
Flow Control Mode	Standard
Pressure	21,636 psi
Total Flow	24 ml/min
Column Flow	1 ml/min
Linear velocity	26,37 cm/sec
Purge Flow	3,0 ml/min
Split Ratio	10:1
Column oven	
Initial Temperature	80°C
Equilibration time	1 min
Temperature program	
Total program time	47 min
Start Temperature	80 °C
Hold time	6 min
Rate ramp 1	5 °C/min
Temperature ramp 1	150 °C
Hold time ramp 1	2,5 min
Rate ramp 2	5 °C/min
Temperature ramp 2	200 °C
Hold time ramp 2	2,5 min
Rate ramp 3	10 °C/min
End temperature ramp 3	250 °C
Hold time ramp 3	7 min
Detector: MS (quadrupole)	
MS source temperature	230 °C
MS Quad temperature	150 °C

GZB-785

Versie: 1
Datum: 01-05- 2025**Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS**

Scan time	3,3 scans/sec
Ionization mode	EI
Scan type	SIM and Scan
SIM Time Segment 1	Time: 11 min. Group name: IS. Ions: 98,00. Dwell time: 100 ms. Resolution: Low
SIM Time Segment 2	Time: 20 min. Group name: TRPM8 group 1. Ions: 43,00- 71,00-112,00. Dwell time: 100 ms per ion. Resolution: Low
SIM Time Segment 3	Time: 32,50 min. Group name: TRPM8 group 2. Ions: 69,00- 82,00-100,00- 114,00 Dwell time: 100 ms per ion. Resolution: Low
Mass Range Scan	30-250 m/z
Tune type	EI

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS**Bijlage 2. Samenvatting resultaten van het validatie onderzoek**

In onderstaande tabel is een samenvatting van de validatieresultaten weergegeven. De bijlagen, vernoemd in onderstaande tabel, worden in het validatieverslag weergegeven. De bijlagen en het validatierapport zijn te vinden onder *R:\Projecten\V090071_Tabakswet\2024\2. Uitvoering 5. Ontwikkeling test- en analysemethoden - verkoelende stoffen\2.3 Resultaten\TRPM8-2024 deel 2\Validatie*

Onderdeel	
Specificiteit	De specificiteit staat weergegeven in bijlage 2 van het validatierapport zijn er massaspectrums van de standaarden die vergeleken worden met de NIST 2023. Dit wordt weergegeven onder het tabblad "specificiteit". Dit is bepaald aan de hand van een hoge concentratie(100 µg/ml) TRPM8 mix. Ook wordt gecontroleerd of de specificiteit eis van <0,05 min wordt behaald. Dit staat weergegeven onder tabblad "Robuustheid_selectiviteit".
LOD en LOQ	De LOQ en LOD is bepaald voor 8 componenten. Het is bepaald aan de hand van de laagste kalibratiestandaard (0,1 µg/ml). De resultaten hiervan staan in bijlage 2 onder het tabblad "LOD_LOQ".
Binnenlab reproduceerbaarheid	De binnenlab reproduceerbaarheid is bepaald aan de hand van 5 validatiedagen. Dit is getoetst aan de eis van een RSD% < 20% waar de acht componenten onder vielen. De blanco opwerkingen waar signaal werd vernomen zijn verrekend met de spike niveaus. Dit staat weergegeven in bijlage 2 onder het tabblad "Binnenlab reproduceerbaarheid".
Lineariteit	Voor de lineariteit zijn de volgende meetpunten gebruikt: 0,00-0,10-0,25-0,50-1,00-2,00-2,50 µg/ml. Er is geen weging meegenomen en de eis is gesteld op R ² van >0,990. Dit wordt weergegeven in bijlage 2 onder het tabblad "lineariteit".
Meetonzekerheid	De meetonzekerheid is bepaald aan de hand van drie verschillende spikes. De meetonzekerheid en uitgebreide meetonzekerheid staan weergegeven in bijlage 2 onder het tabblad "(uitgebreide) meetonzekerheid".
LOR (TIC)	Signal to noise bepaling werd berekend door middel van een 5-voudige injectie(2,5 µg/ml). Er is een eis gesteld op een LOR S/N >10. De S/N bepaling wordt gedaan aan de hand van de TIC die gemeten wordt. Het gemiddelde van de 5 S/N injecties staan weergegeven in bijlage 2 onder tabblad "SN bij std 2,5 ugml".
herhaalbaarheid	De herhaalbaarheid werd bepaald doormiddel van een 5-voudige opwerking per spike niveau op 1 dag. Hieraan werd de eis gesteld om een recovery van 80%-120% te behalen en een RSD% <20%. Dit is op drie verschillende concentratie niveaus gedaan. De herhaalbaarheid en recovery staan weergegeven bijlage 2 onder tabblad "herhaalbaarheid_spike recovery".

Bijlage 3. Procedure voor recovery onderzoek t.b.v. semi kwantitatieve bepaling

Non-targeted screening en verificatie van componenten in tabak en filters m.b.v. GC-MS

Voor recoveryonderzoek wordt referentie sigaret CM9 meegenomen. Aan het filter en tabak wordt er aan de filters en na inweeg van de tabak 100 µl recoverystandaard menthol toegevoegd. Deze monsters worden cf. 6.2 opgewerkt.

De recovery kan worden berekend m.b.v. onderstaande formule:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_{\text{RM}} - C_{\text{BRM}}}{C_{\text{com}}} \times 100\%$$

C_{RM} = Concentratie menthol in recovery CM9 tabak/filter na extractie

C_{BRM} = Concentratie menthol in blanco CM9 tabak/filter na extractie

C_{com} = Berekende concentratie menthol in recovery standaardoplossing